

## **METHOD FOR PRODUCING SOLUBLE IL-15 RECEPTOR $\alpha$ CHAIN**

**Patent number:** JP2003169693  
**Publication date:** 2003-06-17  
**Inventor:** KUMAGAI IZUMI; TSUMOTO KOHEI; MATSUMOTO MITSUHIRO; MISAWA SATORU  
**Applicant:** JAPAN ENERGY CORP  
**Classification:**  
- **International:** C12P21/00  
- **European:**  
**Application number:** JP20010373478 20011207  
**Priority number(s):**

### **Abstract of JP2003169693**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for effectively producing a soluble IL-15 receptor  $\alpha$  chain, by effectively refolding an inactivated IL-15 receptor  $\alpha$  chain which forms an inclusion body to form an activated type thereof.

**SOLUTION:** This method for producing the soluble IL-15 receptor  $\alpha$  chain comprises solubilizing the inclusion body of the IL-15 receptor  $\alpha$  chain with a denaturing agent, making the denatured inclusion body adsorbed by a resin, and continuously contacting the resin with a buffer solution in which the concentration of the denaturing agent is gradually decreased, so that the inclusion body is refolded. An oxidized glutathione and reduced glutathione are preferably added to the buffer solution.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-169693

(P2003-169693A)

(43) 公開日 平成15年6月17日 (2003.6.17)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 P 21/00

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 P 21/00

テームコード\* (参考)

Z N A B 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願2001-373478(P2001-373478)

(22) 出願日 平成13年12月7日 (2001.12.7)

(71) 出願人 000231109

株式会社ジャパンエナジー

東京都港区虎ノ門二丁目10番1号

(72) 発明者 熊谷 泉

宮城県仙台市青葉区川内元支倉35 川内住宅9-307

(72) 発明者 津本 浩平

宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉亀岡住宅13-14

(74) 代理人 100096367

弁理士 藤吉 一夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 可溶性 I L-15 レセプター  $\alpha$  鎖の製造方法

(57) 【要約】

【課題】 封入体を形成した不活性型の I L-15 レセプター  $\alpha$  鎖を効率よく活性型にリフォールディングすることによる可溶性 I L-15 レセプター  $\alpha$  鎖の効率的な生産方法の提供。

【解決手段】 I L-15 レセプター  $\alpha$  鎖の封入体を変性剤で可溶化して樹脂に吸着させた後、当該樹脂を変性剤濃度の漸減した緩衝溶液と接触させてリフォールディングすること、好ましくは、前記緩衝溶液に酸化型及び還元型グルタチオンを添加したことからなる可溶性 I L-15 レセプター  $\alpha$  鎖の製造方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の封入体を変性剤で可溶化して樹脂に吸着させた後、当該樹脂を変性剤濃度の漸減した緩衝溶液と接触させてリフォールディングすることを特徴とする可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の製造方法。

【請求項2】 請求項1の記載において、緩衝溶液に酸化型及び還元型グルタチオンを添加したことを特徴とする可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、遺伝子工学的に原核微生物中で封入体として発現させたIL-15レセプター $\alpha$ 鎖を変性条件化して樹脂に吸着させた後、変性剤濃度を緩やかに低下させた緩衝溶液と接触させることにより高濃度で効率よくリフォールディングし、可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖を製造する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】IL-15はサルの腎臓上皮細胞から分泌され、T細胞株の増殖促進因子として、1994年にcDNAが単離された(Grabstein, K. H., et al., Science 264, 965-968 (1994))。IL-15はIL-2レセプター $\beta$ 鎖及び $\gamma$ 鎖をIL-2と共有していることから、その生理活性はIL-2の作用と類似している。しかし、IL-15を産生する細胞はIL-2とは異なり、IL-15はリンパ球系の細胞では発現が認められず、多くの組織や臓器に発現が認められる。このことからIL-15独自の作用機構が存在するものと考えられる。

【0003】IL-15レセプター $\alpha$ 鎖のcDNAはマウスのTh2細胞株であるD10細胞からクローニングされた(Giri, J. G., et al., EMBO J. 14, 3654-3663 (1995))。分子量は58から60kDaの膜結合型糖タンパク質で、シグナルペプチド、細胞外領域、膜貫通領域及び細胞内領域から構成され、糖鎖結合部位が1カ所存在する。構造上、sushiドメインと呼ばれるモチーフを持つことからIL-2レセプター $\alpha$ 鎖と近縁なレセプターであると考えられる。IL-15レセプター $\alpha$ 鎖は生体内で広範囲に発現が認められ、組織のノーザンハイブリダイゼーション解析において、心臓、脾臓、肺、骨格筋、肝臓に発現が分布することが示されている。更にNK細胞、マクロファージ、B細胞、好中球など多様な細胞種に発現していることが報告されている。IL-15は慢性関節リウマチ(RA)患者の滑液から多量に検出され、その滑液由来T細胞はin vitroにおいてIL-15の添加によりTNF- $\alpha$ の産生を誘導する。また、マウス膠原ゲン関節炎モデルにおいて可溶性マウスIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の投与が関節炎の発症を顕著に抑制することが報告された(Ruchatz, H., et al., J. Immunol. 160, 5654-5660 (1998))。これらの事実、IL-15がRAの病態形成に重要な役割を担って

おり、更にはIL-15の生物活性の中和がRAの病態改善につながることを示している。つまり、可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖は抗リウマチ薬としての臨床応用が期待される蛋白質であり、遺伝子工学的に原核微生物を宿主として大量発現させ、安価な製造プロセスを確立することにより、組換え医薬品としての産業応用が可能になると考えられる。また、可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖に対する低分子アンタゴニストのスクリーニング系を構築する上でも、組換え型可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の大量調製法の確立は重要である。

【0004】すでに可溶性マウスIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の大腸菌を宿主とした発現ならびにリフォールディングの報告はあるものの(Ruchatz, H., et al., J. Immunol. 160, 5654-5660 (1998))、その具体的方法は開示されておらず、また、可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の大腸菌を宿主とした発現ならびにリフォールディングに関する報告はない。可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖を医薬品として開発する場合、免疫原性の観点からヒト由来蛋白質の方が好ましいと考えられる。また、低分子レセプターアンタゴニストをスクリーニングする上でもヒト由来蛋白質を用いることが適切と考えられる。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は上記課題を解決するもので、本発明の目的は封入体を形成した不活性型のIL-15レセプター $\alpha$ 鎖を効率よく活性型にリフォールディングする可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の効率的な生産方法を提供することである。

## 【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者は、上記課題を解決するために、鋭意、研究を進めた結果、新規なリフォールディングプロセスを開発し、可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖を高濃度で効率よく活性型にリフォールディングできる方法を見出した。

【0007】すなわち、本発明は、IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の封入体を変性剤で可溶化して樹脂に吸着させた後、当該樹脂を変性剤濃度の漸減した緩衝溶液と接触させてリフォールディングすること、好ましくは、前記緩衝溶液に酸化型及び還元型グルタチオンを添加したことからなる可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖の製造方法に関する。

## 【0008】

【発明の実施の形態】本発明のIL-15レセプター $\alpha$ 鎖としては、ヒト、サル、マウス、その他、いずれの由来のものでも良く、その封入体としては、原核微生物により産生されたものであれば、特に支障なく用いることができるが、特に、大腸菌にヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖のcDNAを導入した菌、例えば、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターにFERM P-18628として寄託されている形質転換菌E. coli

i BL21/pMTHshIL-15Rを用いて産生されたものを用いることが好ましい。

【0009】このIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の封入体は、組換え大腸菌を培養、増殖させた後、例えば、遠心分離等により菌体を分離して当該菌体を得、これを、10mMリン酸緩衝液(pH7.0)等の菌体破砕用バッファーに懸濁して超音波処理を行い、さらにTriton X-100等の非イオン性界面活性剤で細胞膜を可溶化し、洗浄、分離する方法により、簡便に得ることができる。

【0010】IL-15レセプター $\alpha$ 鎖は分子内に2箇所のジスルフィド結合を有しており、宿主由来の蛋白質と分子間ジスルフィド結合を組み、封入体を形成していると考えられる。したがって、本発明においては、先ず、このIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の封入体を、還元して可溶化させる必要がある。この可溶化は、通常用いられる封入体を可溶化する方法、すなわち変性剤、例えば、グアニジン塩酸溶液や尿素溶液で処理することにより行うことができる。より具体的には、当該封入体1重量部に対して、4～8Mのグアニジン塩酸溶液や尿素溶液を10～100容量部加え、25～40℃の温度で、30分～2時間振盪あるいは攪拌することにより、容易に可溶化できる。なお、可溶化後の溶液については、不溶物を遠心分離等で除くことが好ましく、また純度が低い場合等、必要により、変性剤等の存在下にゲル濾過もしくはイオン交換クロマトグラフィー等で精製することが好ましい。また、可溶化後のIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の濃度は、2～10mg/mlの範囲に調整しておくことが好ましい。

【0011】本発明では、上記方法で可溶化されたIL-15レセプター $\alpha$ 鎖を、樹脂に吸着させるが、この樹脂としては、変性剤として尿素溶液を用いる場合はイオン交換樹脂等を用いることができ、また、変性剤としてグアニジン塩酸溶液のように強いカオトロピックイオンを含むような変性剤溶液を用いる場合、IL-15レセプター $\alpha$ 鎖のN又はC末端側に6残基のヒスチジンタグ(His<sub>6</sub>-tag)を付加して、ニッケルニトリロトリアセート(Ni-NTA)樹脂を用いて吸着させることができ、特に好ましい。このIL-15レセプター $\alpha$ 鎖のN又はC末端側にヒスチジンタグ(His<sub>6</sub>-tag)を付加したものは、IL-15レセプター $\alpha$ 鎖のcDNAに、ヒスチジンタグをコードするDNAを予め結合したもので、大腸菌を形質転換し、IL-15レセプター $\alpha$ 鎖にヒスチジンタグが付加した形態で発現させることが、簡便で好ましい。

【0012】樹脂へのIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の吸着は、上記可溶化後のIL-15レセプター $\alpha$ 鎖を含む溶液100ml当たり、10～100mgの樹脂を加えて、攪拌することにより行うことができるが、同量の樹脂を充填したカラムにIL-15レセプター $\alpha$ 鎖含有溶液を流

下させる方法が、その後の処理が簡便となり好ましい。

【0013】上記方法でIL-15レセプター $\alpha$ 鎖を吸着させた樹脂を、変性剤を含有する緩衝溶液と接触させ、次いで当該変性剤の濃度を漸次低下させた緩衝溶液と接触させることにより、リフォールディングする。この時の緩衝液としては、リン酸ナトリウム、トリス塩酸等の緩衝液を用いることができ、変性剤としては、グアニジン塩酸塩や尿素を用いることができる。この変性剤は、上記可溶化に用いた変性剤と同一であっても異なるものであっても良い。変性剤の濃度は、スタート時では、4～8Mで、その後、直線的勾配で濃度を低減させるとよく、低減速度は、0.1～1M/hrの範囲で適宜選定すればよく、変性剤の濃度が0Mとなった時点で終了する。このリフォールディングの温度は、4～37℃で行うと良い。

【0014】なお、この場合、前記緩衝液に酸化型及び還元型グルタチオンを、それぞれ、0.01～10mMで添加しておくこと、分子内に存在する2箇所のジスルフィド結合をより正確に形成させることができる。

【0015】

【実施例】(ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖(shIL-15R $\alpha$ )発現ベクターの構築と生産菌の調製) shIL-15R $\alpha$ 遺伝子(配列表1)の5'末端にEcoRI切断部位とHis<sub>6</sub>-tagをコードする配列(配列表3)を持つフォワードプライマー(forward primer)、3'末端にはHindIII切断部位を付加するための配列(配列表4)を持つリバースプライマー(reverse primer)をそれぞれ合成した。PCRはTaKaRa LA Taq(宝酒造製)と、テンプレートDNAとしてヒト脾臓のcDNAを用い、95℃で1分間熱変性を行ってから、95℃で30秒間、60℃で1分間、72℃で1.5分間を1サイクルとして30サイクル増幅反応を行った後、72℃で7分間追加伸長してから4℃に保冷した。PCR産物をQIA quick PCR Purification Kit(QIAGEN製)で精製後、EcoRIとHindIIIで消化した。

【0016】shIL-15R $\alpha$ 遺伝子断片を同じ制限酵素で切断した発現ベクターpMT1(特開平03-164184号参照)に連結し、大腸菌JM109株へ導入した。形質転換体を100mlの100 $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する5mlの2 $\times$ YT(2 $\times$ YT-Amp)培地で振とう培養し、shIL-15R $\alpha$ 発現ベクターpMTHshIL-15RをQIAGEN Plasmid Maxi Kit(QIAGEN)により調製した。その発現ベクターを大腸菌BL21株に導入して得られた形質転換体をshIL-15R $\alpha$ 生産菌とした。図1にshIL-15R $\alpha$ 発現ベクターの模式図を示した。図1中のPtrpはトリプトファンプロモーター、rrnB T1T2はrrnBリボソームRNAターミネーター、pUCoriはpUC18複製開始点、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子をそれぞれ示す。

【0017】(shIL-15R $\alpha$ 生産菌の培養と不溶性顆粒の調製) 5mlの2 $\times$ YT-Amp培地を試験管に入れて、shIL-15

R $\alpha$ 生産菌BL21/pMTHshIL-15Rのグリセロール保存液を100  $\mu$ l接種し、37℃、160rpmで3時間振盪培養を行った。100mlの2 $\times$ YT-Amp培地を入れた500ml三角フラスコに先の種培養液2mlを添加し、37℃、160rpmで3時間振盪培養を行った。その種培養液20mlを1Lの2 $\times$ YT-Amp培地を含む5L三角フラスコに添加し、37℃、200rpmで18時間振盪培養を行った。培養終了後、培養液を4℃、6,000rpmで20分間遠心を行って菌体を回収した。得られた培養菌体は使用するまで-80℃に保存した。培養菌体の湿重量1gに対して5mlの50mM Tris-HCl, pH8.0、1mM EDTAで懸濁した後、超音波破碎装置 (Branson製; SONIFIRE 250) により、output control: 4、duty cycle: 70%で1分間、5回処理して菌体を破碎した。4℃、18,000rpmで30分間遠心して不溶性画分を回収した。不溶性画分を50mlの2M尿素、2% Triton X-100、50mM Tris-HCl, pH8.0、1mM EDTAに懸濁後、24℃、160rpmで30分間攪拌し、不溶性画分の洗浄を行った。その後、4℃、18,000rpmで10分間遠心して不溶性画分を回収した。不溶性画分を50mlの超純水に再度懸濁して、4℃、18,000rpmで10分間遠心を行い、得られた不溶性画分をshIL-15R $\alpha$ 封入体として回収した。

【0018】shIL-15R $\alpha$ 封入体の調製及びリフォールディングの過程における純度分析結果を表す電気泳動の結果を図2に示した。shIL-15R $\alpha$ を含む封入体を2M尿素と2% Triton X-100を含む緩衝液で洗浄したが、顕著な洗浄効果は認められなかった。図2中のレーン1は分子量マーカー、レーン2はBL21/pMT1 (コントロール) の全菌体蛋白質、レーン3はBL21/pMTHshIL-15R (shIL-15R $\alpha$ 生産菌) の全菌体蛋白質、レーン4はshIL-15R $\alpha$ 生産菌の可溶性画分、レーン5はshIL-15R $\alpha$ 生産菌の不溶性画分、レーン6は2M尿素/2% Triton X-100洗浄の上清、レーン7は2M尿素/2% Triton X-100洗浄の沈殿、レーン8は8M尿素可溶性画分、レーン9は8M尿素不溶性画分、レーン10はNi-NTAカラム素通り画分、レーン11はリフォールディングの後のNi-NTAカラム溶出画分をそれぞれ示す。

【0019】(shIL-15R $\alpha$ の固相上でのリフォールディング及びアフィニティ精製) shIL-15R $\alpha$ 封入体を1mMジチオスレイトール (DTT) を含有する50mlの8M尿素、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mM NaCl、10%グリセロール、20mMイミダゾール (バッファーA) で懸濁し、24℃、160rpmで16時間攪拌してshIL-15R $\alpha$ 封入体の可溶化を行った。その後、4℃、18,000rpmで30分間遠心し、可溶性画分を回収した。この8M尿素可溶性画分を1mMの還元型グルタチオンと0.2mMの酸化型グルタチオンを含有するバッファーAで平衡化したNi-NTA Superflow (QIAGEN) カラムに負荷し、His<sub>6</sub>-tagを介して変性shIL-15R $\alpha$ をカラムに結

合させた。1mMの還元型グルタチオンと0.2mMの酸化型グルタチオンを含有するバッファーAでカラムを十分洗浄後、1mMの還元型グルタチオンと0.2mMの酸化型グルタチオンを含有する180mlのバッファーAと、1mMの還元型グルタチオンと0.2mMの酸化型グルタチオンを含有する200mlの20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mM NaCl、10%グリセロール、20mMイミダゾール (バッファーB) をグラジエントリザーバーを用いて、次に示す条件で72時間かけてカラムに負荷し、尿素の濃度を直線的に減少させてshIL-15R $\alpha$ の活性型へのリフォールディングを行った。20mlのバッファーBでカラムを洗浄後、300mMイミダゾール、20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mM NaCl、10%グリセロールを、前記と同じ条件でカラムに負荷してshIL-15R $\alpha$ を溶出させた結果、図2のレーン11に示すように高純度のshIL-15R $\alpha$ が高収率で得られた。

【0020】Ni-NTA SuperflowカラムでのshIL-15R $\alpha$ のリフォールディング及び精製条件

カラム: Ni-NTA Superflowカラム (2.2 $\times$ 2.6 cm)

流速: 120ml/h (サンプル負荷、洗浄、溶出)

5.3ml/h (リフォールディング)

分画: 2ml/min/tube

検出波長: 280nm

【0021】(活性再生したshIL-15R $\alpha$ のゲルろ過カラムクロマトグラフィーによる精製) Ni-NTA Superflowカラムから溶出されたshIL-15R $\alpha$ を含む画分を20mMリン酸ナトリウム、pH7.4、150mM NaClで平衡化したSephacryl S-100 HR (Pharmacia Biotech製) カラムに負荷して、次に示した条件でゲルろ過カラムクロマトグラフィーを行った。このゲルろ過カラムクロマトグラフィーにおける各フラクションの280nmにおける紫外吸収のクロマトグラムを図3にAとして、また各フラクションのSDS-PAGEによる純度分析結果を示す電気泳動の結果を図3にBとして示した。

【0022】Sephacryl S-100 HRカラムでのshIL-15R $\alpha$ の精製条件

カラム: Sephacryl S-100 HRカラム (2.2 $\times$ 95 cm)

流速: 27 ml/h

分画: 3.8 ml/8.44 min/tube

検出波長: 280 nm

【0023】図3のAに示すように、排除体積のFr. 31付近に凝集体、Fr. 44付近に単量体と推定されるA280の吸収が検出された。単量体のshIL-15R $\alpha$ を含有する画分 (Fr. 41-47) を1つにまとめて、限外ろ過膜YM-10 (Amicon) で濃縮し、0.22  $\mu$ mのフィルター (Millipore) で無菌ろ過後、-80℃に凍結保存した。

【0024】shIL-15R $\alpha$ は分子内の2箇所のジスルフィド結合の形成がリガンドとの結合に必須であると言われている。今回調製したサンプルがこの結合を形成しているかを確認するために、精製標品を還元剤添加、無添加

の条件でSDS-PAGEを行った。この結果の電気泳動の結果を図4に示した。この図4が示すように、還元剤無添加のサンプルは、添加したサンプルよりも移動度が大きかった。これは分子内でジスルフィド結合を形成した本来の立体構造を有するshIL-15R $\alpha$ であることを示唆している。最終的に培養液1L当たりshIL-15R $\alpha$ 精製標品を1.2mg得ることができた。

【0025】(タンパク質定量) タンパク質濃度は、ウシ $\gamma$ グロブリン (Bio-Rad) を標準タンパク質とし、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて測定した。

【0026】(質量分析) shIL-15R $\alpha$ 精製標品を分画分子量10,000の透析膜MINI Slide-A-Lyser Dialysis Unit (Pierce) を用いて脱塩を行った。そのサンプルの質量分析を四重極型質量分析装置API 300 (Perkin-Elmer Sciex製) により行った。この質量スペクトルを図5に示した。この結果から、分子量は19,020.6Daと算出され、得られた分子量は、His<sub>6</sub>-tagが付加したshIL-15R $\alpha$ に開始メチオニンが付加した分子量とほぼ一致することが判明した。

【0027】(N末端アミノ酸配列分析) 質量分析の結果を受けて、開始メチオニンの有無を確認するためにN末端アミノ酸配列分析を行った。shIL-15R $\alpha$ をSDS-PAGEにより分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へブロットング後、PVDF膜をクマシー染色してshIL-15R $\alpha$ のバンドを可視化した。shIL-15R $\alpha$ のバンドを切り出し、アミノ酸配列分析装置G1005A Protein Sequencing System (Hewlett Packard製) を使用してN末端アミノ酸配列分析を行った。

【0028】その結果、メチオニンにヒスチジン6個が連なった配列が得られ、質量分析の結果から推定された通り、開始メチオニンは除去されていないことが判明した。

【0029】(shIL-15R $\alpha$ のヒトIL-15に対する解離定数の測定) shIL-15R $\alpha$ のヒトIL-15に対する解離定数 ( $K_d$ ) の測定は、生体分子間相互作用解析装置 (日製産業製; IAsys Plus) を用いて行った。10mM 酢酸ナトリウム、pH4.5に溶解し、100 $\mu$ g/mlに調製したヒトIL-15 (PeproTech) 50 $\mu$ lをCM-Dextranキュベットに添加し、N-ヒドロキシサクシンイミドと1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを用いてヒトIL-15を固相化した。PBSTで希釈した750pM、1000pM、2500pM又は5000pMのshIL-15R $\alpha$ をヒトIL-15が固相化されたキュベットに添加して、ヒトIL-15への結合能を評価した。

【0030】得られた結合曲線よりshIL-15R $\alpha$ のヒトIL-15に対する反応速度論的パラメーターを求めた結果、結合速度定数 $k_{on} = 9.56 \times 10^5 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ 、解離速度定数 $k_{off} = 2.88 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 及び $K_d = 3.01 \times 10^{-10} \text{ M}$ と算出された。この $K_d$ 値は、遺伝子導入によ

り細胞表面上に発現させたヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖に対するサルIL-15 (ヒトIL-15と1次構造上96%の相同性を有する。)の解離定数 $K_d \approx 1 \times 10^{-11} \text{ M}$ と近似していることから、shIL-15R $\alpha$ は本来の結合能を保持していることが示唆された。

【0031】(ヒトIL-15応答性CTL-2細胞増殖におけるshIL-15R $\alpha$ の中和活性の測定)  $1 \times 10^5$ /mlのCTL-2細胞懸濁液を100 $\mu$ lずつ96wellプレートに蒔き込んだ ( $1 \times 10^4$ /well)。shIL-15R $\alpha$ を0.04~400nMとなるように10%ウシ胎児血清、100IU/mlのペニシリン及び100 $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むRPMI1640培地 (以降cRPMI1640培地と略す) で希釈した。希釈溶液50 $\mu$ lを先程のCTL-2細胞懸濁液に添加して、更にcRPMI1640培地で希釈した50 $\mu$ lの4nMヒトIL-15 (Biogenesis) または4nMヒトIL-2 (GenzymeTechnique) を加えて37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO<sub>2</sub>で24時間培養を行った。培養終了4時間前に0.05mCi/mlの(<sup>3</sup>H)チミジンを含むcRPMI1640培地を20 $\mu$ lずつ添加し (1 $\mu$ Ci/well)、培養を継続した。培養終了後、細胞をセルハーベスターでUniFilter-GF/Cプレート (Packard) にハーベストし、プレートを乾燥後、各wellに液体シンチレーター (Packard製; Microscint-20) を20 $\mu$ lずつ添加した。細胞内に取り込まれた(<sup>3</sup>H)チミジンの放射活性はシンチレーションカウンター (Packard製; TopCount) を使用して、Data Mode: CPM, Radionuclide: 3H-MicroScint, Count Time: 2min, Count Delay: 2minの条件で測定した。

【0032】得られた結果を、図6に、可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖精製標品の濃度 (対数目盛) に対する細胞内に取り込まれた(<sup>3</sup>H)チミジン量のグラフとして示した。この図6に示すようにヒトIL-15によるCTL-2細胞の増殖に対して濃度依存的なshIL-15R $\alpha$ の中和活性が確認された ( $IC_{50} = 518 \text{ pM}$ )。また、shIL-15R $\alpha$ は、ヒトIL-15と類似の構造を有するヒトIL-2の増殖活性に対しては中和活性を示さなかった。このことは、shIL-15R $\alpha$ ヒトIL-15に対して特異的に結合することを示唆している。

【0033】

【発明の効果】本発明はIL-15レセプター $\alpha$ 鎖の封入体を変性剤で可溶化して樹脂に吸着させた後、緩衝液中の変性剤濃度を緩やかに低下させてリフォールディングするために、高濃度で効率よく可溶性IL-15レセプター $\alpha$ 鎖を製造でき、また、前記リフォールディングの際に、当該緩衝液に酸化型及び還元型グルタチオンを添加するようにすると、分子内に存在する2箇所のジスルフィド結合を正確に形成させることができるという格別の効果を奏する。

【0034】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;;110&gt;; JAPAN ENERGY CORPORATION

&lt;;120&gt;; Preparation for soluble IL-15 receptors

&lt;;130&gt;; FJ131126A1

&lt;;140&gt;;

&lt;;141&gt;;

&lt;;160&gt;; 4

&lt;;170&gt;; PatentIn Ver. 2.1

&lt;;210&gt;; 1

&lt;;211&gt;; 540

&lt;;212&gt;; DNA

&lt;;213&gt;; human

&lt;;220&gt;;

&lt;;221&gt;; CDS

&lt;;222&gt;; (1)..(540)

&lt;;400&gt;; 1

atg	cat	cac	cat	cac	cat	cac	agc	agc	ggc	atc	acg	tgc	cct	ccc	ccc	48
Met	His	His	His	His	His	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Thr	Cys	Pro	Pro	Pro	
1				5					10					15		

atg	tcc	gtg	gaa	cac	gca	gac	atc	tgg	gtc	aag	agc	tac	agc	ttg	tac	96
Met	Ser	Val	Glu	His	Ala	Asp	Ile	Trp	Val	Lys	Ser	Tyr	Ser	Leu	Tyr	
			20					25						30		

tcc	agg	gag	cgg	tac	att	tgt	aac	tct	ggt	ttc	aag	cgt	aaa	gcc	ggc	144
Ser	Arg	Glu	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asn	Ser	Gly	Phe	Lys	Arg	Lys	Ala	Gly	
		35				40							45			

acg	tcc	agc	ctg	acg	gag	tgc	gtg	ttg	aac	aag	gcc	acg	aat	gtc	gcc	192
Thr	Ser	Ser	Leu	Thr	Glu	Cys	Val	Leu	Asn	Lys	Ala	Thr	Asn	Val	Ala	
		50				55						60				

cac	tgg	aca	acc	ccc	agt	ctc	aaa	tgc	att	aga	gac	cct	gcc	ctg	gtt	240
His	Trp	Thr	Thr	Pro	Ser	Leu	Lys	Cys	Ile	Arg	Asp	Pro	Ala	Leu	Val	
	65				70				75					80		

cac	caa	agg	cca	gcg	cca	ccc	tcc	aca	gta	acg	acg	gca	ggg	gtg	acc	288
His	Gln	Arg	Pro	Ala	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Thr	Thr	Ala	Gly	Val	Thr	
			85						90					95		

cca	cag	cca	gag	agc	ctc	tcc	cct	tct	gga	aaa	gag	ccc	gca	get	tca	336
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser  
100 105 110

tct ccc agc tca aac aac aca gcg gcc aca aca gca gct att gtc ccg 384  
Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro  
115 120 125

ggc tcc cag ctg atg cct tca aaa tca cct tcc aca gga acc aca gag 432  
Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu  
130 135 140

ata agc agt cat gag tcc tcc cac ggc acc ccc tct cag aca aca gcc 480  
Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala  
145 150 155 160

aag aac tgg gaa ctc aca gca tcc gcc tcc cac cag ccg cca ggt gtg 528  
Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln Pro Pro Gly Val  
165 170 175

tat cca cag ggc 540  
Tyr Pro Gln Gly  
180

<;210>; 2  
<;211>; 180  
<;212>; PRT  
<;213>; human

<;400>; 2  
Met His His His His His His Ser Ser Gly Ile Thr Cys Pro Pro Pro  
1 5 10 15

Met Ser Val Glu His Ala Asp Ile Trp Val Lys Ser Tyr Ser Leu Tyr  
20 25 30

Ser Arg Glu Arg Tyr Ile Cys Asn Ser Gly Phe Lys Arg Lys Ala Gly  
35 40 45

Thr Ser Ser Leu Thr Glu Cys Val Leu Asn Lys Ala Thr Asn Val Ala  
50 55 60

His Trp Thr Thr Pro Ser Leu Lys Cys Ile Arg Asp Pro Ala Leu Val  
65 70 75 80

His Gln Arg Pro Ala Pro Pro Ser Thr Val Thr Thr Ala Gly Val Thr  
85 90 95

Pro Gln Pro Glu Ser Leu Ser Pro Ser Gly Lys Glu Pro Ala Ala Ser  
100 105 110



Ser Pro Ser Ser Asn Asn Thr Ala Ala Thr Thr Ala Ala Ile Val Pro  
 115 120 125

Gly Ser Gln Leu Met Pro Ser Lys Ser Pro Ser Thr Gly Thr Thr Glu  
 130 135 140

Ile Ser Ser His Glu Ser Ser His Gly Thr Pro Ser Gln Thr Thr Ala  
 145 150 155 160

Lys Asn Trp Glu Leu Thr Ala Ser Ala Ser His Gln Pro Pro Gly Val  
 165 170 175

Tyr Pro Gln Gly  
 180

<;210>; 3  
 <;211>; 62  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence:forward primer

<;400>; 3  
 gcgaattcat gcacacccat caccatcaca gcagcgccat cacgtgccct ccccccatgt 60  
 cc 62

<;210>; 4  
 <;211>; 33  
 <;212>; DNA  
 <;213>; Artificial Sequence

<;220>;  
 <;223>; Description of Artificial Sequence:reverse primer

<;400>; 4  
 gcaagcttag ccctgtggat acacacctgg cgg

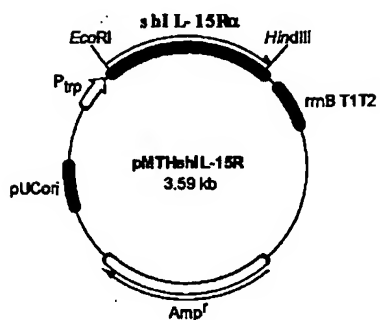
【図面の簡単な説明】

【図1】 可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖発現ベクターの模式図  
 【図2】 SDS-PAGEによる可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖封入体の調製及びリフォールディングにおける純度分析結果を示す電気泳動の結果の図  
 【図3】 活性再生した可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖のゲル透過カラムクロマトグラフィーのクロマトグラム(A)及び各クラクションの純度を示す電気泳動

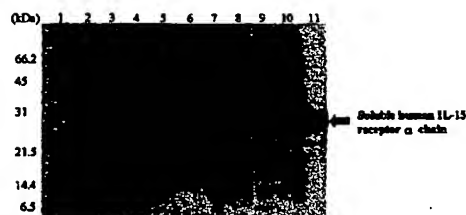
の結果の図(B)

【図4】 SDS-PAGEによる可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖精製標品に対する還元剤の影響を示す電気泳動の結果の図  
 【図5】 可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖精製標品の質量分析スペクトルを示す図  
 【図6】 ヒトIL-15応答性CTL-2細胞増殖における可溶性ヒトIL-15レセプター $\alpha$ 鎖精製標品の中和活性を示すグラフ

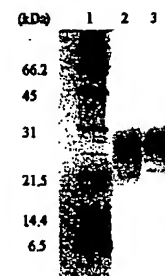
【図1】



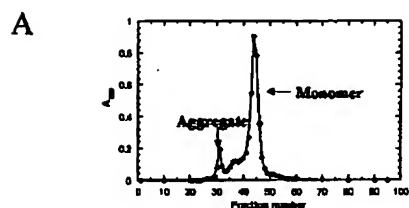
【図2】



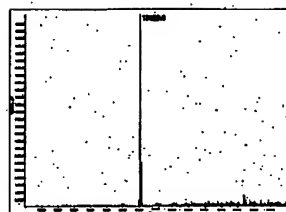
【図4】



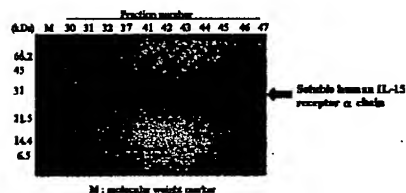
【図3】



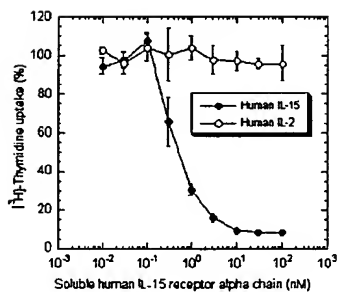
【図5】



B



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 松本 光広  
埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式  
会社ジャパンエナジー内

(72)発明者 三沢 悟  
埼玉県戸田市新曽南三丁目17番35号 株式  
会社ジャパンエナジー内  
Fターム(参考) 4B064 AG20 CA02 CA19 CC24 CE02  
CE03 CE11 CE12 DA01